Cat No. 08211-96

取　扱　説　明　書

分子生物学用

シカジーニアス® RNA 抽出試薬

1. はじめに

シカジーニアス® RNA 抽出試薬は、微生物や動物等の試料から全 RNA を抽出するための試薬です。本試薬と試料を混合し、インキュベートするだけの簡単な操作で RT-PCR 等に使用可能なテンプレート RNA が調製できます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニアス® RNA 抽出試薬 (Cica Geneus® RNA Extraction Reagent)
製品番号	08211-96
容量	120 回分
保管温度	2－8 ℃

3. キットの構成

品名	容量・本数
試薬 a 液	1.2 ml × 1
試薬 b 液	12.0 ml × 1
試薬 c	凍結乾燥品 × 1
試薬 d 液	630 µl × 1
取扱説明書	1 部

4. 原理

シカジーニアス® RNA 抽出試薬の試薬 a 液と試薬 b 液によって生体膜を速やかに可溶化して全 RNA とゲノム DNA を抽出し、次いで試薬 c と試薬 d 液によって DNA を分解します。また、試料に由来する RT-PCR 阻害物質の作用を抑制する働きもあるため、本試薬で抽出した全 RNA は、精製操作を行うことなく RT-PCR 等にそのまま使用可能です。なお、消防法、毒物及び劇物取締法等に該当しません。

5. 適用範囲

細菌・真菌を含む試料(液体培養や平板培養にて増菌、分離したものも含む)、動物試料等

6. 試薬の準備

1) 本試薬を最初に使用する前に、試薬 d 液を静かに転倒混和し、その全量を試薬 c を含むバイアル瓶に入れ、ピペッティングにより穏やかに溶解してゲノム DNA 分解溶液を調製して下さい。この混合液は常に氷上に静置して使用し、使用後は-20℃にて保管して下さい。
2) 使用直前に試薬 a 液および試薬 b 液を静かに転倒混和して下さい。次いで、試薬 a 液、試薬 b 液を 1:10 の比率で混合し、RNA 抽出試薬混合液を調製して下さい(表 1)。

表 1. RNA 抽出試薬混合液の調製例

検体数	試薬 a 液(µl)	試薬 b 液(µl)
1	10	100
10	100	1,000
120	1,200	12,000

7. 標準プロトコール（RT-PCR 試料作製）

1) 先に調製した RNA 抽出試薬混合液 100 µl を 200 µl 容マイクロチューブに入れます。
2) 試料 10 µl を上記マイクロチューブに入れ、軽く混合します(使用上の注意事項の 1)、2)参照)。
3) 65℃ 6 分間、次いで 94℃ 3 分間インキュベートします。
4) この反応液を遠心分離します(10,000×*g*、5 分間)。
5) 反応液の上清 5 µl を新しいマイクロチューブへ移し、先に調製したゲノム DNA 分解溶液 5 µl と RNase フリー水(別途用意) 45 µl を入れ、軽く混合します。
6) 37℃ 15 分間、次いで 75℃ 5 分間インキュベートし、氷冷したものをテンプレート RNA とします。

8. 使用上の注意事項

1) 微生物の平板培養の場合は、コロニーを滅菌水にマクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1～3 番程度となるように懸濁したものを試料として使用して下さい。あるいは、ごく少量のコロニーを掻き取り、RNA 抽出試薬混合液に直接懸濁することも可能です。菌濃度は濃すぎないようにご注意下さい(適宜調整して下さい)。
2) 動物試料の場合は細胞数 10^5 個を目安にして下さい。
3) 試料の量に応じて、添加する RNA 抽出試薬混合液の量を適宜調整することもできます。
4) 標準プロトコールにて RNA が抽出できない場合は、65℃のインキュベート時間を延長する(例えば 10 分間)ことで改善されることがあります。
5) 逆転写反応に供するテンプレート RNA 溶液は、総液量の 50%以下として下さい。
6) 試料の種類によっては、夾雑成分が RNA 抽出試薬混合液中に多く溶出され、ゲノム DNA 分解や RT-PCR が阻害されることがあります。この場合、ゲノム DNA 分解混合液を加える前に反応液の上清を適宜希釈することで改善されることがあります。
7) テンプレート RNA 溶液は使用まで冷蔵で保存し、早めにご使用下さい。また、直ちに使用しない場合は-80℃にて保管し、凍結・融解の繰り返しは避けて下さい。
8) 本試薬は試験研究用としてご使用下さい。研究目的以外の用途には使用しないで下さい。

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号 (03)6214-1090
〒541-0048 大阪市中央区瓦町 2 丁目 5 番 1 号 (06)6231-1672
〒812-0007 福岡市博多区東比恵 2 丁目 22 番 3 号 (092)414-9361
《URL; http://www.kanto.co.jp/, e-mail; reag-info@gms.kanto.co.jp》

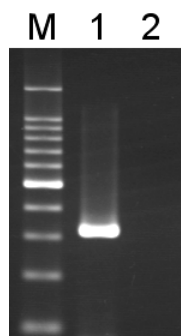
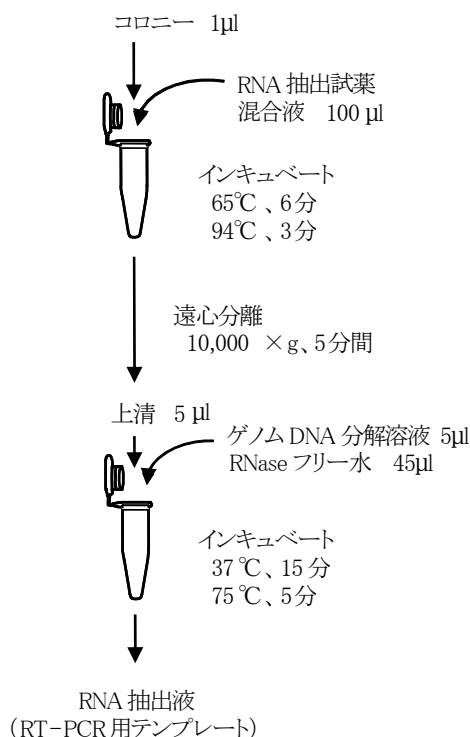
Cat No. 08211-96

取　扱　説　明　書

分子生物学用

シカジーニアス® RNA 抽出試薬

シカジーニアス® RNA抽出試薬を用いた黄色ブドウ球菌からのRNA抽出とRT-PCRによる 16S rRNAの増幅例

RNA 抽出液
（RT-PCR 用テンプレート）

M 分子量マーカー（100 bp DNA Ladder）
1. シカジーニアス® RNA 抽出試薬による RNA 抽出液
2. レーン 1 と同様の試験で、逆転写反応時に PrimeScript RT Enzyme Mix I の代わりに超純水を使用したもの

増幅遺伝子：黄色ブドウ球菌　16S rRNA（324 bp）
プライマー配列は以下の文献を参照。

McKillip JL, et al. (1998). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4264-4268.

電気泳動条件：

3% TBE アガロースで泳動後、臭化エチジウム溶液に 30 分間浸し、トランスイルミネーターでバンドを検出した。

- 試薬 a 液、試薬 b 液を 1:10 の比率で混合し、RNA 抽出試薬混合液を調製した。
- 試薬 c を含むバイアル瓶に試薬 d 液を入れて溶解し、ゲノム DNA 分解溶液を調製した。
- マイクロチューブに RNA 抽出試薬混合液を 1 検体あたり 100 µl 入れた。
- SCD 寒天培地に播種して 37℃、一晩培養して得られた黄色ブドウ球菌のコロニーをループで 1 µl 程度かき取り、RNA 抽出試薬混合液に懸濁した。
- ヒートブロックを使用してインキュベート後、遠心分離した（10,000×*g*、5 分間）。
- 新しいマイクロチューブに、遠心分離後の上清 5 µl、ゲノム DNA 分解溶液 5 µl、RNase フリー水 45 µl を混合し、ヒートブロックを使用してインキュベートした。
- インキュベート後の溶液をテンプレート RNA として RT-PCR を行った。

逆転写反応液組成：

テンプレート RNA	5.0 ul
5x PrimeScript Buffer	2.0 ul
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 µl
Primer-Reverse (2 pmol/µl)	0.5 µl
滅菌水	2.0 µl
合計	10.0 µl

逆転写反応条件：42℃　15 分　→85℃　5 秒

PCR 反応液組成：

逆転写反応液	2.0 ul
AptaTaq DNA Master (5x conc.)	4.0 ul
Primer-Forward (10 pmol/µl)	1.0 µl
Primer-Reverse (10 pmol/µl)	1.0 µl
滅菌水	12.0 µl
合計	20.0 µl

PCR 反応条件：

(94℃　30 秒，　54℃　90 秒，　72℃　60 秒)×30 回 →72℃　7 分

黄色ブドウ球菌以外のアプリケーションについては、弊社までお問い合わせください。

〒103-0022　東京都中央区日本橋室町 2 丁目 2 番 1 号　(03)6214-1090
〒541-0048　大阪市中央区瓦町 2 丁目 5 番 1 号　(06)6222-2796
〒812-0007　福岡市博多区東比恵 2 丁目 22 番 3 号　(092)414-9361
《URL; http://www.kanto.co.jp/, e-mail; reag-info@gms.kanto.co.jp》